



10/629, 158

## MACHINE-ASSISTED TRANSLATION (MAT):

(19)【発行国】

日本国特許庁 ( J P )

(19)[ISSUING COUNTRY]

Japan Patent Office (JP)

(12)【公報種別】

公開特許公報 ( A )

(12)[GAZETTE CATEGORY]

Laid-open Kokai Patent (A)

(11)【公開番号】

特開平 7-274978

(11)[KOKAI NUMBER]

Unexamined Japanese Patent Heisei 7-274978

(43)【公開日】

平成 7 年 ( 1 9 9 5 ) 1 0 月 2  
4 日

(43)[DATE OF FIRST PUBLICATION]

October 24, Heisei 7 (1995. 10.24)

(54)【発明の名称】

紅麴色素の製造方法

(54)[TITLE OF THE INVENTION]

Manufacturing method of Monascus color

(51)【国際特許分類第 6 版】

C12P 1/02

7417-4B

C09B 61/00

E

/(C12P 1/02

(51)[IPC INT. CL. 6]

Z C12P 1/02

Z 7417-4B

C09B 61/00

E

/(C12P 1/02

C12R 1:645 )

C12R 1:645 )

【審査請求】 未請求

[REQUEST FOR EXAMINATION] No

【請求項の数】 8

[NUMBER OF CLAIMS] 8

【出願形態】 O L

[FORM OF APPLICATION] Electronic

【全頁数】 5

[NUMBER OF PAGES] 5



(21) 【出願番号】

特願平 6-74722

(21)[APPLICATION NUMBER]

Japanese Patent Application Heisei 6-74722

(22) 【出願日】

平成 6 年 ( 1 9 9 4 ) 4 月 1 3 日

(22)[DATE OF FILING]

April 13, Heisei 6 (1994. 4.13)

(71) 【出願人】

【識別番号】

593226869

(71)[PATENTEE/ASSIGNEE]

[ID CODE]

593226869

【氏名又は名称】

有限会社バイオコスモス

[NAME OR APPELLATION]

Limited company bio-cosmos

【住所又は居所】

[ADDRESS OR DOMICILE]

(72) 【発明者】

【氏名】 遠藤 章

【住所又は居所】

(72)[INVENTOR]

[NAME OR APPELLATION] Endo Akira

[ADDRESS OR DOMICILE]

(72) 【発明者】

【氏名】

村川 茂雄

【住所又は居所】

(72)[INVENTOR]

[NAME OR APPELLATION]

Murakawa Shigeo

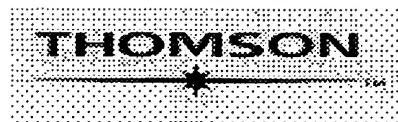
[ADDRESS OR DOMICILE]

(74) 【代理人】

【弁理士】

(74)[AGENT]

[PATENT ATTORNEY]



## 【氏名又は名称】

塩澤 寿夫 (外1名)

## [NAME OR APPELLATION]

Shiosawa Hisao (and 1 other)

## (57) 【要約】

## (57)[ABSTRACT OF THE DISCLOSURE]

## 【構成】

モナスカス・ピロサス・グループまたはモナスカス・ルバー・グループに属する菌株を用いて実質的にシトリニンを含有しない紅麴色素を製造する方法、モナスカス・パープレウス種、モナスカス・アルビズス種、モナスカス・ルビギノサス種、及びモナスカス・メイジャー種からなる群から選ばれるモナスカス属に属する菌株を用いて実質的にシトリニンを含有しない紅麴色素を製造する方法、およびモナスカス・アンカ種に属しシトリニン含有紅麴色素を産生する菌株を変異させてシトリニンを産生せずに紅色系生産能を保持した変異株を製造する方法。

## [CONSTITUTION]

Method to manufacture Monascus color which does not contain citrinin substantially using strain belonging to Monascus pilosus group or Monascus ruber group, method to manufacture Monascus color which does not contain citrinin substantially using strain belonging to genus Monascus selected from the group consisting of Monascus purpureus species, Monascus albidus species, Monascus rubiginosus species, and Monascus measure species, and method of manufacturing mutant which maintained red group producing ability without mutating strain which belongs to Monascus anka species and produces citrinin content Monascus color, and producing citrinin.

## 【効果】

本発明の方法により製造した紅麴色素はシトリニンを含有していないので、食品添加物としての安全性に優れているという特徴を有する。

## [ADVANTAGE]

Since Monascus color manufactured by the method of this invention does not contain citrinin, it has characteristics of excelling in safety as food additive.

## 【特許請求の範囲】

## [CLAIMS]

**【請求項 1】**

モナスカス・ピロサス・グループまたはモナスカス・ルバー・グループに属する菌株を用いて実質的にシトリニンを含有しない紅麴色素を製造する方法。

**[CLAIM 1]**

Method to manufacture Monascus color which does not contain citrinin substantially using strain belonging to Monascus pilosus group or Monascus ruber group.

**【請求項 2】**

モナスカス・パープレウス種、モナスカス・アルビズス種、モナスカス・ルビギノサス種、及びモナスカス・メイジャー種からなる群から選ばれるモナスカス属に属する菌株を用いて実質的にシトリニンを含有しない紅麴色素を製造する方法。

**[CLAIM 2]**

Method to manufacture Monascus color which does not contain citrinin substantially using strain belonging to genus Monascus selected from the group consisting of Monascus purpureus species, Monascus albidus species, Monascus rubiginosus species, and Monascus measure species.

**【請求項 3】**

モナスカス・ピロサス・グループまたはモナスカス・ルバー・グループに属する菌株を培養した培養物から実質的にシトリニンを含有しない紅麴色素を分離・採取することを特徴とする紅麴色素の製造方法。

**[CLAIM 3]**

It separates and collects Monascus color which does not contain citrinin substantially from culture which cultivated strain belonging to Monascus pilosus group or Monascus ruber group.

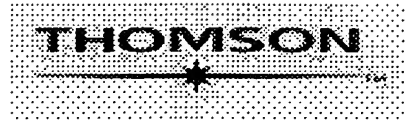
Manufacturing method of Monascus color characterized by the above-mentioned.

**【請求項 4】**

モナスカス・パープレウス種、モナスカス・アルビズス種、モナスカス・ルビギノサス種、及びモナスカス・メイジャー種からなる群から選ばれるモナスカス属に属する菌株を培養した培養物から実質的にシトリニンを

**[CLAIM 4]**

It separates and collects Monascus color which does not contain citrinin substantially from culture which cultivated strain belonging to genus Monascus selected from the group consisting of Monascus purpureus species, Monascus albidus species, Monascus rubiginosus species, and Monascus measure



含有しない紅麴色素を分離・採取することを特徴とする紅麴色素の製造方法。

species.

Manufacturing method of Monascus color characterized by the above-mentioned.

【請求項 5】

モナスカス・アンカ種に属しシトリニン含有紅麴色素を産生する菌株を変異させてシトリニンを産生せずに紅色系生産能を保持した変異株を製造する方法。

[CLAIM 5]

Method to manufacture mutant which maintained red group producing ability without mutating strain which belongs to Monascus anka species and produces citrinin content Monascus color, and producing citrinin.

【請求項 6】

変異株がモナスカス・アンカ 4478A 又はモナスカス・アンカ 4478B である請求項 5 記載の方法。

[CLAIM 6]

The method of Claim 5 that mutant is Monascus anka 4478A or Monascus anka 4478B.

【請求項 7】

モナスカス・アンカ種に属しシトリニンを産生せずに紅色系生産能を保持した菌株。

[CLAIM 7]

Strain which maintained red group producing ability without belonging to Monascus anka species and producing citrinin.

【請求項 8】

モナスカス・アンカ 4478A 又はモナスカス・アンカ 4478B である請求項 7 記載の菌株。

[CLAIM 8]

Strain of Claim 7 which is Monascus anka 4478A or Monascus anka 4478B.

【発明の詳細な説明】

[DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION]

【0001】

[0001]

【産業上の利用分野】

本発明は紅麴色素に関するもの

[INDUSTRIAL APPLICATION]

This invention relates to Monascus color.



である。さらに詳しくは、本発明はシトリニン生産能のない紅麴菌を用いる紅麴色素の製造に関する。

In more detail, this invention relates to manufacture of Monascus color using Monascus microbe without citrinin producing ability.

## 【 0 0 0 2 】

## [0002]

## 【従来の技術】

紅麴色素は紅麴菌（モナスカス属）の培養により生産される紅色系色素を抽出することにより得られる色素である。従来、紅麴色素の生産には、専らモナスカス・アンカ（Monascus anka）が利用されてきた。その理由は、この種に色素生産能の高い株が含まれているということにある。モナスカス・アンカを培養して得られる紅麴は、古くから東洋、特に中国と東南アジア諸国において、漢方薬、食品の保存剤、並びに酒類と漬物等の製造に広く利用されている。近年、本菌の生産する紅色系色素は天然色素としてその価値が評価され、水産加工食品をはじめとする多くの食品の着色剤として利用されるようになった（遠藤章：発酵と工業 43 巻、pp.544-552, 1985）。

## [PRIOR ART]

Monascus color is pigment obtained by extracting red group pigment produced by culture of Monascus microbe (genus Monascus).

Formerly, Monascus anka (Monascus anka) is chiefly utilized for production of Monascus color. The reason for that is that

It exists in high stock of pigment producing ability being contained in this species.

Monascus obtained by cultivating Monascus anka is widely utilized for manufacture of Chinese medicine, preservative of foodstuffs and liquor, pickles, etc. in East, especially China and southeast Asian nations from old times.

In recent years, the value is evaluated as a natural coloring matter, and red group pigment which this microbe produces came (Endo chapter: fermentation, 43 industry, pp.544-552, 1985) to be utilized as tinction of foodstuffs of many including fish processing foodstuffs.

## 【 0 0 0 3 】

## [0003]

最近、本発明者らは、従来紅麴色素の生産に利用されてきた紅麴菌のほとんどが、米の黄色カビが産生する毒素として知られ

Recently, present inventors newly discovered that most Monascus microbes formerly utilized for production of Monascus color produced citrinin (Citrinin:3



る シ ト リ ニ ン (Citrinin: R-trans-4,6-dihydro-8-hydroxy-3,4,5-trimethyl-6-3R-trans-4,6-dihydro-8-hydroxy -oxo-3H-2-benzopyran-7-carboxylic acid:Merck -3,4,5-trimethyl-6-oxo-3H-2-ben Index 11th edition, 2329) known as toxin which zopyran-7-carboxylic acid: yellow fungi of rice produce. Merck Index 11th edition, 2329) Citrinin is powerful toxin. (refer to VI volume and pp.357-367 as an outline in Saito Kadis, A. Aji [ "Yellowed Rice Toxins," Microbial Toxins: A. Ciegler, S.] edition, Academic Press, New York, and 1971) It is substance which must not be contained also although trace amount is told to Monascus color which should be essentially added to foodstuffs. However, although it is trace amount to many one of Monascus color formerly used by edible, citrinin contains. This fact is very serious. It is necessary to provide immediately Monascus color which changes to such a Monascus color and does not contain citrinin.

を生産していることを新たに発見した。シトリニンは強力な毒素であり (総説として、斉藤ら "Yellowed Rice Toxins," Microbial Toxins: A. Ciegler, S. Kadis, A. Aji 編、アカデミック・プレス社、ニューヨーク、1971 年、VI 巻、pp.357-367 を参照)、本来、食品に添加されるべき紅麴色素には微量といえども含有されてはならない物質である。しかしながら、従来食用に供されてきた紅麴色素の多くのものに微量ではあるがシトリニンが含有されている。この事実は極めて深刻であり、このような紅麴色素にかえてシトリニンを含有しない紅麴色素を緊急に提供する必要がある。

【 0 0 0 4 】

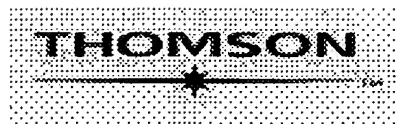
[0004]

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、シトリニンを含有しない紅麴色素を提供することにある。本発明の別の目的は、シトリニンを含有しない紅麴色素を産生する紅麴菌を提供することにある。さらに本発明は、シトリニンを含有しない紅

[PROBLEM TO BE SOLVED BY THE INVENTION]

Objective of the invention is providing Monascus color which does not contain citrinin. Another objective of this invention is providing Monascus microbe which produces Monascus color which does not contain citrinin. More, this invention cultivates Monascus microbe which produces Monascus color which



麴色素を産生する紅麴菌を培養し、培養物からシトリニンを含むしない紅麴色素を分離・精製する方法を提供することを目的とするものである。

does not contain citrinin, and aims at providing method of separating and purifying Monascus color which does not contain citrinin from culture.

**【課題を解決するための手段】**

本発明者は上記の目的を達成するため、種々の紅麴菌株を収集してシトリニンを生産しない菌株を探索した。その結果、一部の紅麴菌株がシトリニンを生産しないことを見出し、本発明を完成するに至った。

**[MEANS TO SOLVE THE PROBLEM]**

This inventor looked for strain which collects various Monascus strains and does not produce citrinin in order to attain the above-mentioned objective.

As a result, some Monascus strains discover not producing citrinin and came to perfect this invention.

**【0005】**

すなわち本発明は、モナスカス・ピロサス・グループまたはモナスカス・ルバー・グループに属する菌株を用いて実質的にシトリニンを含むしない紅麴色素を製造する方法、およびモナスカス・パープレウス種、モナスカス・アルビズス種、モナスカス・ルビギノサス種、及びモナスカス・メイジャー種からなる群から選ばれるモナスカス属に属する菌株を用いて実質的にシトリニンを含むしない紅麴色素を製造する方法を提供するものである。

**[0005]**

That is, this invention provides method of manufacturing Monascus color which does not contain citrinin substantially using strain belonging to genus Monascus selected from the group consisting of method of manufacturing Monascus color which does not contain citrinin substantially using strain belonging to Monascus pilosus group or Monascus ruber group and Monascus purpureus species, Monascus albidus species, Monascus rubiginosus species, and Monascus measure species.

**【0006】**

本発明の別の観点からは、モナスカス・ピロサス・グループまたはモナスカス・ルバー・グル

**[0006]**

From another viewpoint of this invention, it separates and collects Monascus color which does not contain citrinin substantially from



ープに属する菌株を培養した培養物から実質的にシトリニンを含有しない紅麴色素を分離・採取することを特徴とする紅麴色素の製造方法、及びモナスカス・パープレウス種、モナスカス・アルビズス種、モナスカス・ルビギノサス種、及びモナスカス・メイジャー種からなる群から選ばれるモナスカス属に属する菌株を培養した培養物から実質的にシトリニンを含有しない紅麴色素を分離・採取することを特徴とする紅麴色素の製造方法が提供される。

#### 【0007】

また、本発明は、モナスカス・アンカ種に属しシトリニン含有紅麴色素を産生する菌株を変異させてシトリニンを産生せずに紅色系生産能を保持した変異株を製造する方法を提供するものであり、その一態様として、変異株がモナスカス・アンカ 4478A 又はモナスカス・アンカ 4478B である上記方法が提供される。さらに、モナスカス・アンカ種に属しシトリニンを産生せずに紅色系生産能を保持した菌株、並びにモナスカス・アンカ 4478A 又はモナスカス・アンカ 4478B である上記菌株も提供される。

culture which cultivated strain belonging to Monascus pilosus group or Monascus ruber group.

It separates and collects Monascus color which does not contain citrinin substantially from culture which cultivated strain belonging to genus Monascus selected from the group consisting of manufacturing method of Monascus color characterized by the above-mentioned and Monascus purpureus species, Monascus albidus species, Monascus rubiginosus species, and Monascus measure species.

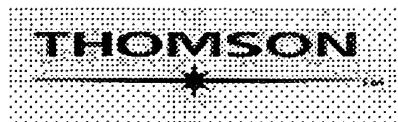
Manufacturing method of Monascus color characterized by the above-mentioned is provided.

#### [0007]

Moreover, this invention provides method of manufacturing mutant which maintained red group producing ability without mutating strain which belongs to Monascus anka species and produces citrinin content Monascus color, and producing citrinin.

As the one aspect, the above-mentioned method mutant is Monascus anka 4478A or Monascus anka 4478B is provided.

More, the above-mentioned strain which is strain which maintained red group producing ability without belonging to Monascus anka species and producing citrinin and Monascus anka 4478A, or Monascus anka 4478B is also provided.



## 【0008】

モナスカス属のシトリニン生産性の比較

シュクロース 3 %、ポリペプトン 1 %、酒石酸 0.1 %、L-アスパラギン 0.3 %、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1 %、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05 %、消泡剤 (CB442) 0.01 % (pH 4.4) からなる培地を坂口フラスコ (500 ml 容) に 100 ml ずつ分注し、120 °C で 20 分間滅菌した。この培地に斜面培養した各種モナスカス属菌株を接種して、25°C で 10 日間振とう培養した。培養液 10 ml を濾過し、その液体を pH2~3 に調整後、10 ml の酢酸エチルで 2 度抽出した。抽出液を無水硫酸ソーダで脱水後に減圧乾固し、1 ml のメタノールに溶解した。メタノール溶液を 0°C で 10 分間遠心 (10,000×g) した上清を検定に供した。

## 【0009】

合成培地等を用いた場合のように培養液に夾雑物が少ない場合には、培養濾液を 10 ml に調製した後、10 ml のメタノールを加えて冷却し、10 分間遠心 (10,000×g) して上清を取り検定に供した。十分に母液を除いた菌体 (培養液 10ml 相当) を 5 ml のメタノールで 2 回抽出し、抽出液を減圧乾固して 1 ml のメタノールに溶解した。上記

## [0008]

Comparison of citrinin productivity of genus *Monascus*

Sucrose 3 %, polypeptone 1 %, tartaric acid 0.1 %, L- asparagine 0.3 %, it dispensed 100 ml of media which are made up of  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1 %,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05 %, and antifoamer (CB442) 0.01% (pH 4.4) to each Sakaguchi flask (500 ml), and sterilized for 20 minutes at 120 degrees C.

It vaccinated various genus-*Monascus* strains which made slant culture to this medium, and made shake culture for ten days at 25 degrees C.

It filtrates 10 ml of culture mediums, and is the liquid pH2-3 10 ml ethyl acetate extracted twice after adjustment.

It depressurizingly dried extract after dehydration with sulfuric-anhydride soda, and dissolved in 1 ml methanol.

It used in assay supernatant which made at-long-intervals heart (10,000\*g) of the methanol solution at 0 degree C for 10 minutes.

## [0009]

When synthetic medium etc. is used

When culture medium has little contaminant, after preparing culture filtrate to 10 ml, it adds 10 ml methanol and cools, it made at-long-intervals heart (10,000\*g) for 10 minutes, took supernatant, and used in assay.

5 ml methanol fully extracts microbial cell (an equivalent for 10 ml of culture mediums) except mother liquid twice, it depressurizingly dried extract and dissolved in 1 ml methanol.

It used in assay supernatant which made



の条件で冷却遠心した上清を検定に供した。上述の条件で調製した試料（培養液相当量として 10 ～50  $\mu$ l）を用い下記の件で分析した。

カラム：シリカ C<sub>18</sub> (Inertsil ODS 6×250 mm)

流動相：アセトニトリル：0.1 % リン酸水=55 : 45

流速：1.0 ml/min.

cooling centrifugation on condition of above.

It analyzed regarding following using sample (10-50 microliter as a culture-medium equivalent amount) prepared on condition of above-mentioned:

Column: Silica C<sub>18</sub> (6×250 mm of InertsilODS(s))

Flow phase :

Acetonitrile:0.1% phosphoric-acid water =55:45

Flow rate: 1.0 ml/min.

検出器：UV マルチチャンネル 検出器、235 nm

Detector: UV multichannel detector, 235 nm

#### 【0010】

上記条件でシトリニンの保持時間は 14～15 分であった。試料中のシトリニンはピークの保持時間及びピークの UV 吸収パターンより確認してピーク面積により定量し、同定は質量分析、NMR 分析等により行った。上記条件での標準シトリニン試料の検出限界は 0.05  $\mu$ g/injection 以下であった。シトリニンの検出結果を表 1 に示す。なお、ホークスワースらの提案により、モナスカス属をモナスカス・ピロサス・グループ、モナスカス・パープレウス・グループ及びモナスカス・ルバー・グループの 3 グループに整理して示した(D.L.ホークスワース、J.I.ピット、オーストラリアン・ジャーナル・オブ・ボタニー、31 巻、51 頁、1983 年)。

#### [0010]

Holding time of citrinin was 14-15 minutes on the above-mentioned conditions.

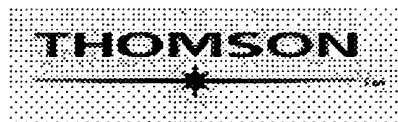
Citrinin in sample

It checks from holding time of peak, and UV absorption pattern of peak, and assays with peak area, mass spectrometry, NMR analysis, etc. performed identification.

Detection limit of standard citrinin sample in the above-mentioned conditions was below 0.05 microgram/injection.

Detected result of citrinin is shown in Table 1.

In addition, proposal of Hawkesworth, et al., genus *Monascus* was arranged and shown in 3 of *Monascus pilosus* group, *Monascus purpureus* group, and *Monascus ruber* group groups (D. L. Hawkesworth, J.I. pit, Australian journal-of botany, 31 volumes, 51 pages, 1983). More, productivity of citrinin is another medium (two kinds) from which medium composition differs. Similar results were acquired when inquired.



さらに、シトリニンの生産性は  
培地組成の異なる他の培地(2  
種) で検討したところ、同様の  
成績が得られた。また、培養温  
度を 30℃にしてもシトリニン  
の生産性に変化はなかった。

Moreover, it was changeless for productivity of  
citrinin as for 30 degrees C in culture  
temperature.

【0011】

[0011]

【表1】

[TABLE 1]

モナスカ  
ス属のシトリニンの生産性

Productivity of citrinin of genus Monascus

---



---



---

Monascus (Monascus) Source  
Citrinin throughput

モナスカス (Monascus) 種  
シトリニン生産量

(microgram/ml)

(μg/ml)

---



---



---

M. pilosus (PILOSUS) GROUP  
M. pilosus (PILOSUS) IFO 4480, 4520  
ALSO ANY 0

M. ピロサス (pilosus) グル  
ープ

M. ピロサス (pilosus) IFO  
4480, 4520  
いずれも 0

M. プビゲルス (pubigerus)  
IFO 4521  
0

M. Pubigerus (PUBIGERUS) IFO 4521  
0

M. セロルベセンス  
(serorubescens) IFO 4487,  
4525 いずれも 0

M. serorubescens (SERORUBESCENS)  
IFO 4487, 4525 ALSO ANY 0

---

M. purpureus (PURPUREUS) GROUP



M. パープレウス (purpureus)  
グループ

M. パープレウス M. purpureus (PURPUREUS) IFO 4513,  
(purpureus) IFO 4513, AHU AHU 9096, 9451  
9096, 9451 ATCC 6405, 16436, 16385, 16386, 16365,  
ATCC 6405, 16436, 16427 All 0  
16385, 16386, 16365, 16427 M. anka (ANKA) IFO 4478  
すべて 0 235  
M. アンカ (anka) IFO 4478 IFO 6540  
235 -1

IFO

6540

~ 1

IFO IFO 30873  
30873 35  
35 IFO 32228  
IFO 18  
32228 IFO 32316  
18 13  
IFO M. Anka (ANKA) VAR. rubellus  
32316 (RUBELLUS) IFO 5965 16  
13

M. アンカ (anka) var. ル  
ベルス (rubellus) IFO 5965  
16

IFO 6085 0 IFO 6085 0  
IFO 6085 0 M. kaoliang (KAOLIANG) MO-F1  
M. カオリアング (kaoliang) 47  
MO-F1 M. albidus (ALBIDUS) IFO 4489  
47 0  
M. アルビズス (albidus) M. rubiginosus (RUBIGINOSUS) IFO 4484



IFO 4489 0  
0

M. ルビギノサス  
(rubiginosus) IFO 4484  
0

M. メイジャー (major) IFO 4485  
0  
M. major (MAJOR) IFO 4485  
0

M. ruber (RUBER) GROUP  
M. ruber (RUBER) IFO 4492  
OTHERS -- 10 STRAIN  
ALL -- 0

M. ルバー (ruber)グループ  
M. ルバー (ruber) IFO 4492  
ほ か 10 株  
すべて 0

M. パキシイ (paxii) IFO 8201  
0  
M. paxii (PAXII) IFO 8201  
0  
M. フリギノサス  
(fuliginosus) IFO 4483  
0  
M. fuliginosus (FULIGINOSUS) IFO 4483  
0

M. ビトレウス (vitreus) IFO 4532, 7537  
0  
M. vitreus (VITREUS) IFO 4532, 7537  
ALSO ANY 0

M. ビトレウス (vitreus) IFO 4532, 7537  
0  
M. barker (BARKERI) ATCC 16966  
0  
いずれも 0

M. バルケリ (barkeri)  
ATCC 16966  
0

In addition, M. used for Monascus-color  
manufacture in Japan and neighboring  
countries now Anchor (anka) What  
belongs  
M. SP (SP.) T1 (THAILAND)

その他、日本および近隣諸国で  
紅麴色素製造に現在使用されて  
いる



M. アンカ (anka) に 112

属するもの

M. エスピー (sp.) T1 (タ  
イ )

112

( 日 本 ) 343 343 (JAPAN)  
156 156 030

( 日 本 ) 030 277 (JAPAN)

( 日 本 ) 12N 61 (Japan)  
277 61

( 日 本 ) 12N 202-13 (JAPAN)  
61 13

( 日 本 ) 202-13  
13

( 台 湾 ) H4 H4 (Taiwan)  
3 3

( 台 湾 ) T4 T4 (Taiwan)  
32 32

( 台 湾 ) C2 C2 (Cambodia)  
102 102

( カンボジア ) C2 VN-3 (VIETNAM)  
102 2

( ベトナム ) VN-3  
2

( )  
2

( )  
2

( )  
2

( )  
2

( )  
2



## 【0012】

表1に示された結果から明らか  
なとおり、モナスカス・アンカ  
に属する菌株は、試験した全株  
にシトリニン生産能が認められ  
た。現在紅麹色素の製造に用い  
られている株はいずれもモナス  
カス・アンカに分類されるもの  
である。これに反して、モナス  
カス・ピロサス・グループ、モ  
ナスカス・ルバー・グループに  
属する菌株にはシトリニン生産  
性がまったく認められなかつ  
た。従って、モナスカス・ピロ  
サス・グループ、モナスカス・  
ルバー・グループに属する菌株  
はいずれも本発明に用いること  
ができる。また、モナスカス・  
パープレウス・グループの中で  
は、モナスカス・パープレウス  
種は試験した9株がすべてシ  
トリニンを生産していなかつ  
た。従って、本発明にはモナス  
カス・パープレウス種に属する  
菌株を用いることもできる。さ  
らに、モナスカス・アルビズス  
種、モナスカス・ルビギノサス  
種、またはモナスカス・メイジ  
ャー種に属する菌株も上記試験  
においてシトリニンを生産して  
おらず、本発明に用いることが  
できる。

## 【0013】

上記の表1に示される菌株のう  
ち、シトリニンを産生しない

## [0012]

As for passage clear from result shown in Table  
1, citrinin producing ability was observed in all  
stocks that examined strain belonging to  
Monascus anka.

Each stock used for manufacture of the present  
Monascus color is classified into Monascus  
anka.

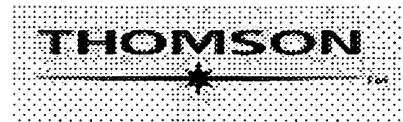
It is contrary to with this, citrinin productivity was  
not observed in strain belonging to Monascus  
pilosus group and Monascus ruber group at all.  
Therefore, it can use each strain belonging to  
Monascus pilosus group and Monascus ruber  
group for this invention.

Moreover, in Monascus purpureus group,  
Monascus purpureus species is 9 examined. All  
stocks did not produce citrinin.

Therefore, it can also use strain belonging to  
Monascus purpureus species for this invention.  
More, strain belonging to Monascus albidus  
species, Monascus rubiginosus species, or  
Monascus measure species cannot produce  
citrinin in the above-mentioned test, either, but  
can use it for this invention.

## [0013]

Each stock (what citrinin throughput was  
indicated to be 0) which does not produce



株（シトリニン生産量が0と記載されたもの）は、いずれも本発明に好適に用いることのできる菌株の具体例であるが、本発明に使用される菌株はこれらに限定されることはない。本発明には、実質的にシトリニンが産生されない菌株、具体的にいえば、シトリニンの産生量が  $1 \mu\text{g/ml}$  以下、好ましくは  $0.1 \mu\text{g/ml}$  以下、特に好ましくはシトリニンの産生が全くないか、あるいは産生量が  $0.05 \mu\text{g/ml}$  以下の菌株を用いることができる。シトリニンの産生がなく、かつ紅麴色素の色彩が良好であるという観点から、本発明には、モナスカス・パープレウス種に属する菌株を好適に用いることができる。例えば、表1に記載されたモナスカス・パープレウス IFO 4513, AHU 9096, 9451, ATCC 6405, 16436, 16385, 16386, 16365, 16427 等は、本発明に特に好適に用いることができる菌株である。

#### 【0014】

本発明に従って、上記の菌株を用いてシトリニンを含有しない紅麴色素を製造するには、当業者に周知の方法により上記菌株を培養し、培養物からそれ自体公知の方法により紅麴色素を分離・採取すればよい。その例を以下の実施例に具体的に示す

citrinin among strains shown in the above-mentioned table 1 is example of strain in which it can use conveniently for this invention. Strain used for this invention is not limited to these.

If it mentions strain and concrete target with which citrinin is not substantially produced by this invention, the amount of productions of citrinin is 1 microgram/less than ml, preferably 0.1 microgram/ml or less, most preferably, there is no production of citrinin, or the amount of productions can use strain which is 0.05 microgram(s)/less than ml.

There is no production of citrinin and it can use strain belonging to Monascus purpureus species for this invention conveniently from viewpoint that color of Monascus color is good. For example, Monascus purpureus 9096 and AHU [ IFO4513 and ] 9451 described in Table 1, ATCC 6405, 16436, 16385, 16386, and 16365, and 16427 grades are strains which can be used for this invention especially suitably.

#### [0014]

In order to manufacture Monascus color which does not contain citrinin using the above-mentioned strain according to this invention, it cultivates the above-mentioned strain by the well-known method to those skilled in the art, what is sufficient is just to separate and collect Monascus color by the method of public knowledge in itself from culture.



が、本発明の方法はこれらの方法に限定されることはなく、当業者はこの実施例を基にして菌株に応じて培養条件を適宜選択し、シトリニンを含む紅麴色素を製造することができる。

#### 【0015】

また、本発明の別な態様によれば、シトリニン産生能を有するモナスカス・アンカを各種変異剤、例えば紫外線照射、ニトロソグアニジン、亜硝酸、アルキル化剤、ヒドロキシアミン等による単独または組合せ処理により処理して、シトリニンを生産せずに紅色系生産能を保持した変異株を産生する方法、並びに該方法により製造される変異株が提供される。

#### 【0016】

モナスカス・アンカがシトリニンを生産することは、本発明の研究によりはじめて明らかにされたことであり、従来全く知られていなかった。また、モナスカス・アンカによるシトリニンの生合成経路と紅色系色素の生合成経路の相互関係に関する知見は従来皆無である。従って、本菌のシトリニン生産能を失わせて紅色系色素の生産能は保持させることが可能か否かは、従

The example is specifically shown in the following Examples.

However, the method of this invention is not limited to these method, and those skilled in the art can choose culture condition suitably according to strain based on this Example, and can manufacture Monascus color which does not contain citrinin.

#### [0015]

Moreover, according to another aspect of this invention, by itself or the method of producing mutant for which it maintained red group producing ability without treating by combination treatment and producing citrinin, and mutant manufactured by this method according Monascus anka which has citrinin production ability to various variation agents, for example, ultraviolet irradiation, nitrosoguanidine, nitrous acid, alkylating agent, hydroxy amine, etc. are provided.

#### [0016]

Monascus anka's producing citrinin is that research of this invention clarified for the first time.

Formerly it was not known at all.

Moreover, formerly there are no findings about correlation of biosynthesis pathway of citrinin and biosynthesis pathway of red group pigment by Monascus anka.

Therefore, whether it is possible to lose citrinin producing ability of this microbe and to maintain producing ability of red group pigment is being unable to estimate at all to those skilled in the



来の知見からは当業者にも全く予測できないことである。本発明の方法によりシトリニン産生能を有するモナスカス・アンカを処理するための方法としては、それ自体公知の変異株製造方法を用いることができる。例えば、各種変異剤、例えば紫外線照射、ニトロソグアニジン、亜硝酸、アルキル化剤、ヒドロキシアミン等による単独または組合せ処理を用いることができるが、これらに限定されることはない。シトリニン産生能を喪失したか否かは、上記の方法により検定すればよい。

art from findings of past.

As method for treating Monascus anka which has citrinin production ability by the method of this invention, it can use mutant manufacturing method of public knowledge in itself.

For example, it can use individual or combination treatment by various variation agents, for example, ultraviolet irradiation, nitrosoguanidine, nitrous acid, alkylating agent, hydroxy amine, etc.

However, it is not limited to these.

What is sufficient is just to assay whether it lost citrinin production ability by the above-mentioned method.

【0017】

[0017]

【実施例】

[EXAMPLES]

【実施例 1】

[EXAMPLE 1]

シュクロース 10%、ペプトン 1%、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05%、酒石酸 0.1%、アスパラギン 0.3% (pH 4.4) からなる液体培地 100 ml を坂口フラスコ (500 ml 容) にとり、滅菌後、モナスカス・ピロサス IFO 4480 株を接種して 30 °C で 10 日間振とう培養した。培養液を濾過して菌体を集めた。この菌体に 70% エタノール 50ml 加えて 3 時間攪拌抽出し、抽出液を濾過して濾液を採取した。この濾液を減圧下

They are after sterilization and Monascus pilosus IFO4480 for Sakaguchi flask (500 ml volume) in sucrose 10% and peptone 1% and  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1%,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05%, 0.1% of tartaric acid, and 100 ml of broths which are made up of asparagine 0.3% (pH4.4). It vaccinated stock and made shake culture for ten days at 30 degrees C.

It filtrated culture medium and collected microbial cells.

It added 50 ml of 70% ethanol to this microbial cell, made churning extraction for 3 hours, it filtrated extract, and collected filtrate.

It concentration-dried this filtrate under reduced



で濃縮乾固し、シトリニンを含まない粗紅麴色素 110 mg を得た。

pressure, and obtained 110 mg of rough Monascus colors which do not contain citrinin.

#### 【実施例 2】

パン粉 5 %、グルコース 3 % からなる液体培地 100 ml を 500 ml 容三角フラスコにとり、常法により滅菌後、モナスカス・パープレウス IFO 4513 を接種して 30 °C で 10 日間培養した。培養物から実施例 1 の方法に準じてシトリニンを含まない粗紅麴色素 180 mg を得た。

#### [EXAMPLE 2]

For 500-ml conical flask, it vaccinated after sterilization and Monascus purpureus IFO4513 by conventional method, and cultivated 5% of bread crumbs, and 100 ml of broths which are made up of glucose 3% for ten days at 30 degrees C.

It obtained 180 mg of rough Monascus colors which do not contain citrinin according to the method of Example 1 from culture.

#### 【0018】

##### 実施例 3

モナスカス・アンカ IFO 4478 株 (表 1、シトリニン生産能 235  $\mu$ g/ml) を常法により紫外線で処理した。生育した 1,200 株の中から、紅麴色素生産能を保持しており、かつシトリニン生産能が 1  $\mu$ g/ml 以下の変異株 1 株 (4478A 株) を得た。

#### [0018]

##### Example 3

It treated 04478 strain (Table 1, 235 microgram/ml citrinin producing ability) of Monascus ankas IF by ultraviolet rays by conventional method.

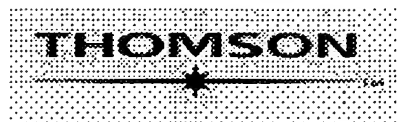
Out of 1,200 grown strain, it maintained Monascus-color producing ability, and citrinin producing ability obtained 1 strain (4478 A shares) of mutant which is 1 microgram/less than ml.

#### 【実施例 4】

実施例 3 で得た 4478A 株を常法によりニトロソグアニジンで処理した。得られた約 2,000 株の中から、シトリニン生産能が 0.1  $\mu$ g/ml 以下の変異株 (4478B) を取得した。

#### [EXAMPLE 4]

It treated 4478 A shares obtained in Example 3 by nitrosoguanidine by conventional method. Citrinin producing ability acquired mutant (4478B) which is 0.1 microgram(s)/less than ml out of about 2,000 obtained strain.



【 0 0 1 9 】

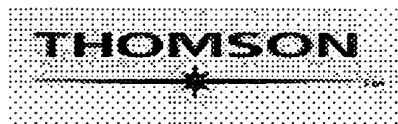
[0019]

【発明の効果】

本発明の方法により製造した紅麴色素はシトリニンを含有しておらず、食品添加物としての安全性に優れているという特徴を有するので有用である。

[ADVANTAGE OF THE INVENTION]

Since Monascus color manufactured by the method of this invention has characteristics of not containing citrinin but excelling in safety as food additive, it is useful.



## THOMSON SCIENTIFIC TERMS AND CONDITIONS

*Thomson Scientific Ltd shall not in any circumstances be liable or responsible for the completeness or accuracy of any Thomson Scientific translation and will not be liable for any direct, indirect, consequential or economic loss or loss of profit resulting directly or indirectly from the use of any translation by any customer.*

Thomson Scientific Ltd. is part of The Thomson Corporation

Please visit our website: ["www.THOMSONDERWENT.COM"](http://www.THOMSONDERWENT.COM) (English)  
["www.thomsonscientific.jp"](http://www.thomsonscientific.jp) (Japanese)